

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-036198

(43)Date of publication of application : 06.02.1992

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
C12Q 1/04

(21)Application number : 02-144196

(71)Applicant :

SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 31.05.1990

(72)Inventor :

YAMAGATA KOICHI
SHIRASAKI YOSHINARI
OHASHI TETSUO
TADA ATSUSHI
FUKUSHIMA SHIGERU

(54) METHOD FOR EXAMINING FOOD POISONING BACTERIUM

(57)Abstract:

PURPOSE: To quickly, simply, safely and inexpensively obtain a bacterial cell ingredient and simply identifying and examining the title bacterium by passing a suspension through a plural filters having different diameters to catch the bacterial cell ingredient and subjecting the bacterial cell ingredient to polymerase chain reaction.

CONSTITUTION: A suspension containing a food poisoning bacterium is successively passed through the first and second filters having different diameters to remove an insoluble solid content and then a bacterial ingredient is caught by the third filter different in diameter from the above-mentioned filters and a solution containing the caught bacterial ingredient is subjected to polymerase chain reaction and DNA of desired bacterium is amplified to carry out examination of desired food poisoning bacterium.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A) 平4-36198

⑬ Int.Cl.⁵C 12 Q 1/68
1/04

識別記号

庁内整理番号

6807-4B
6807-4B

⑭ 公開 平成4年(1992)2月6日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 食中毒菌の検査方法

⑯ 特 願 平2-144196

⑰ 出 願 平2(1990)5月31日

⑱ 発 明 者 山 形 浩 一 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 発 明 者 白 崎 良 成 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 発 明 者 大 橋 鉄 雄 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 発 明 者 多 田 淳 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑳ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

㉑ 代 理 人 弁理士 武石 靖彦 外2名

最終頁に続く

細 細 要

1 発明の名称

食中毒菌の検査方法

2 特許請求の範囲

1 食中毒を含む懸濁液を口径の違う第1、第2のフィルターに順次通し不溶性固分を除去した後、前記フィルターと口径の違う第3フィルターにより菌体成分を捕捉し、該捕捉した菌体成分を含む懸液をポリメラーゼ連鎖反応法に付して所望の菌のDNAを増幅させることにより所望の菌の検査を行うことを特徴とする食中毒菌の検査方法。

3 発明の詳細な説明

(1) 産業上の利用分野

本発明は細菌により病気を引き起こした人や動物の検体の懸濁液(例えば糞便)より食中毒菌を捕獲、DNAを抽出し、検査する方法に関する方法である。

(2) 従来の技術

臨床診断や研究の分野において、生物試料中の食中毒菌の種類を同定したり、その構成成分を分析するための調査を種々の方法で寒天プレート上で培養することは以前から行われていた。

生物試料のなかでも糞便などの水溶性固形分(食物残渣や腸内細菌細胞等)を含む試料中にある食中毒菌を溶解して菌体成分を得る従来の方法では試料の懸濁液を培地につけて数日間培養を行い、得られたコロニーを採取してこれを遠心分離し菌体を分離回収する。そしてこれを溶解液中でプロテオースKのような酵素あるいはドデシル硫酸ナトリウムのような界面活性剤あるいは水酸化ナトリウムのようなアルカリを用いて溶解させたり超音波、あるいはミルのような物理的破砕方法で細菌を破砕したりすることで菌体成分を得る。

また従来の細菌同定法では例えばある特定の抗生物質を含んだ寒天などの培地に前記試料をまき、その結果として生えてくる菌体群を分別し、さらにこの分別された菌体群をまた別の抗

生物質の含まれる希地にまき分別を繰り返す分離培養法、あるいは菌体に固有の抗体をラテックスビーズに固定し、これを前記試料中に添加しビーズ表面の抗体が菌体を認識することによりビーズが凝集することを利用するラテックス凝集法、ポリエチレン製プレートビーズに1次抗体を結合させこれに菌体を作用させ、抗原-抗体反応により結合するものと、しないものとをより分け、さらに酵素や蛍光物質により標識された2次抗体を作用させR/F分離後酵素活性や蛍光強度を測定することで同定するサンドイッチ抗体法、あるいは前記コロニーをメンブランフィルターに転写し菌体特異的なDNA断片に酵素や放射活性物質などを標識したDNAプローブを作用させて遺伝子レベルで検出するDNAプローブ法がある。この方法はコロニー中のDNA中にDNAプローブと相補的な塩基配列があると両者の間に水素結合が生じることを利用して目的の食中毒菌等を検出する方法である。

含む菌液をポリメラーゼ連鎖反応法に付して所望の菌のDNAを増幅させることにより所望の食中毒菌の検査を行うことを特徴とする。

(四) 作用

本発明は、まず細菌を含む懸濁液を粗い第1フィルターに通し不溶性固形分を分離する。次に調液に菌菌剤を加え菌体成分を遊離させる。そして、第2フィルターによってさらに細かい不溶性固形分を除去する。ここで得られた調液に核酸成分凝集剤を加え、核酸成分を沈降させ更に第3フィルターを通し、第3フィルター内に核酸成分を捕捉する。これを70%エタノール水溶液により洗浄し、更に99%エタノール水溶液により洗浄し、水または界面活性剤の水溶液を第3フィルター中に流入させ、核酸成分を溶出させる。

溶出させた核酸成分はポリメラーゼ連鎖反応を用い増幅させるための検査法全体としても迅速かつ簡便なものとなる。また迅速に結果が得られるため病原菌に特異的に作用する抗生物質の投

与が実現しようとする課題

しかしながら前記の菌体成分を得る方法はいずれも培養に長時間を要するため、菌体成分を迅速に得ることができないのが難点である。とくに食中毒を起こすような原因菌の場合、早期に原因菌の検定し抗生物質などの投与を行うことが病原菌の蔓延の阻止及び治療に大きな効果をもたらす。また従来より研究目的で一般に用いられている核酸抽出法は遠心機等の高価な装置や、フェノール、クロロホルムなどの危険な有機溶媒を必要とし、実際の臨床検査現場には適用し難い。本発明の目的は食中毒原因菌を簡便に安全に、そして安価に同定し得る細菌検査法を提供することにある。

(五) 課題を解決するための手段

本発明は、上記課題を解決するため、食中毒菌を含む懸濁液を口径の違う第1、第2のフィルターに順次通し、不溶性固形分を除去した後前記フィルターと口径の違う第3フィルターにより菌体成分を捕捉し、該捕捉した菌体成分を

与を行うことができる。

(六) 実施例

(試料液の調製)

ヒト糞便0.4g、セレクス菌(1CM2152株)10⁶個、10⁷個、または10⁸個/1g糞便を50mMリン酸塩緩衝液(pH7.0)(以下PB)4mlに懸濁して得た。

(粗懸濁液処理)

上記で得られた試料液を用いて濾過処理を行った。アドバンテック社製PP-47フィルターホルダーにボアサイズ10μmのナイロンメッシュを張着し、10ml用シリンジに試料液を入れ、フィルターホルダーに挿入し、濾過した。

(核酸処理)

上記で得られた調液にN-アセチルムラミデースを60μg/ml、アクロモペプチダーゼを1mg/ml、なるように加え、37℃で10分間インキュベートした。さらにSDSを1%、プロテアーゼKを1mg/mlになるように加え、60℃で30分間インキュベートした。さらに95℃で10分

菌インキュベートし、プロテオースⅩを失活させた。

(菌液処理)

得られた菌液に 1/10 量の 2.5 M KCl 水溶液を加え、SDS 成分を凝集させた後、溶液 2 ml について MILLEX-PP 0.8 μm filter unit MILLEX GV 0.22 μm filter unit を通し、不溶性成分と SDS 成分を取り除いた。

(エタノール沈澱処理)

得られた菌液に 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、2 倍量の 99% 冷エタノールを加えた。

(核酸成分の捕捉)

4 ϕ のフィルターホルダー (自作) に GF/D (WHATMAN 社製 ガラス繊維濾紙) を多層し、上で得られた液を通過した。さらにこのフィルターを 70% 冷エタノール、99% 冷エタノールにより洗浄した。

(核酸成分の溶出)

上記フィルターに 1 ml 用シリンジを用いて 2.5 μl の 0.5% NONIDET P-40、0.5% Tween 2

0 水溶液を滴入させ、50℃ 10 分間インキュベートした後、シリンジを操作して核酸成分を回収した。

(DNA の増幅)

上記菌液を、またはその 10 倍、100 倍希釈液を 5 μl 取り器具的に目的 DNA を増やす方法であるポリマーゼチェーン反応 (PCR 法 Saiki, R. S. et al. science 239 487-491 (1988)) を 4 時間行った。ここで上記 PCR 法は以下の条件で行った。すなわち、蒸留水 26.5 μl 、dNTP 8 μl (1.25 mM 各 dNTP)、プライマー 2.5 μl (20 μM) 2 種、10 倍緩衝液 5 μl (パーキンエルマーシータス社製)、Taq ポリマーゼ 2.5 ユニット (同社製) の合計 50 μl にミネラル油 100 μl を蒸発防止剤として添加して、DNA thermal cycler (同社製) にセットした。

ここで言う 10 倍緩衝液とは 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0)、500 mM KCl 、15 mM MgCl_2 である。

プライマーは大崎らの特開平 1-185681 に

記載したセレウス菌に特異的な DNA 塩基配列を用いた。また各プライマーは DNA 自動合成装置 NS-1 (島津製作所製) を用いて合成し逆相カラムを備えた高速液体クロマトグラフィーで精製したものをを用いた。

PCR 反応の温度サイクルは変性 94℃ 1 分、アニーリング 37℃ 1 分、伸長 60℃ 1 分、1 サイクル 5.7 分、42 サイクルで行った。

(検出)

上記 PCR 後の溶液を 20 μl とり、エチウムブロマイドを含む 2% アガロースゲルで 100 V 35 分間電気泳動を行った後、トランスイルミネーター上にゲルを置き波長 320 nm の UV 光を照射したところ PCR 反応で増幅した DNA は蛍光を発した。その蛍光をインスタントフィルムを装着したカメラにて撮影した結果を第 1 図に示した。セレウス菌がサンプル中 (糞便中) に含まれている懸濁液を本発明による方法を実施した後の電気泳動パターンを第 1 図のレーン 1 から 9 に示す。レーン 1、2、3 は 10^6 個、レー

ン 4、5、6 は 10^7 個、レーン 7、8、9 は 10^8 個セレウス菌を糞便 1g 中へ含んだ糞便懸濁液について本発明を実施したパターンである。レーン 1、4、7 は精出原液、レーン 2、5、8 はそれらの 10 倍希釈液、レーン 3、6、9 は 100 倍希釈液を PCR に付したものである。レーン 10 はセレウス菌のポジティブコントロールである。M は λ 174 DNA を制限酵素 Hinc II で完全消化して得られた分子量マーカーであり、A、B、C、D は対応する塩基対の数である。

その結果約 232 塩基対の位置にバンドが出現した。これは同時に電気泳動したポジティブコントロールサンプル (第 1 図のレーン 10) と同じ位置であることからセレウス菌を特異的に検出できたことがわかる。ここで言うポジティブコントロールとはセレウス菌の標準株 (JCM 2152 株) を液体培地中で培養したもの、あるいは、界面活性剤で溶菌した後フェノール、クロ

ロホルム抽出、エタノール沈殿を施して得たDNA溶液を用いたものである。

上記結果からこの発明の細菌検査法によれば、糞便中1グラムにセレウス菌が少なくとも 10^4 個含まれていれば上記方法により簡便かつ5時間以内という短時間で検出できることがわかった。

(ト) 効果

本発明の方法によれば、非常に挟雑物の多い糞便のような生体試料中に含まれるDNAを含んだ菌体成分を迅速、簡便、安全、そして安価に入手することができ、かつポリメラーゼ連鎖反応を用

いるため検査法全体としても簡便なものとなり5時間以内という短時間で目的の病原菌を同定することができる。

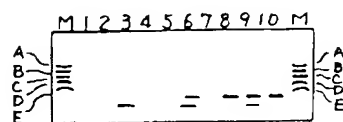
◆ 図面の簡単な説明

第1図はこの発明の方法を実施した後の電気泳動パターン図である。

特許出願人 株式会社 島 津 製 作 所

代 理 人 井 理 士 武 石 清 彦

(以下 余白)



第1図

A---1057bp
B---770
C---612
D---495
E---350

第 1 頁の続き

②発 明 者 福 島

繁

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製
作所三条工場内